

# Poly(ADP-ribose) polymerase interacts with novel Drosophila ribosomal proteins, L22 and L23a, with unique histone-like amino-terminal extensions

著者	小山 由美
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 2147, 1999.3.25 Joint authors: Shoichiro Katagiri ... et al Offprint. Originally published in: Gene, v. 226, pp. 339-345, 1999
発行年	1999
その他のタイトル	ショウジョウバエ・ポリ(ADP-リボース)合成酵素はアミノ末端にヒストン類似の配列を持つ新規ナリボソームタンパク質L22, L23aと相互作用する
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/1358">http://hdl.handle.net/2241/1358</a>

氏 名 (本 籍)	小 <sup>こ</sup> 山 <sup>やま</sup> 由 <sup>ゆ</sup> 美 <sup>み</sup> (埼 玉 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 2,147 号		
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	Poly (ADP-ribose) polymerase interacts with novel <i>Drosophila</i> ribosomal proteins, L22 and L23a, with unique histone-like amino-terminal extensions (ショウジョウバエ・ポリ (ADP-リボース) 合成酵素はアミノ末端にヒストン類似の配列を持つ新規なりボソームタンパク質 L22, L23a と相互作用する)		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	梶 正 幸
副 査	筑波大学教授	理学博士	坂 内 四 郎
副 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副 査	筑波大学客員教授	医学博士	林 崎 良 英
	(理化学研究所)		
副 査	筑波大学助教授	理学博士	志 賀 隆

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) は、真核生物におけるタンパク質への翻訳後修飾の一つであるポリ ADP リボシル化反応を担う酵素として発見された。現在まで、この酵素が遺伝子の修復、複製、アポトーシスなどに関与しているという報告があるが、生物学的な意義は解っていない。我々は遺伝学的解析が容易なショウジョウバエを用いて PARP の意義を調べて来た。ショウジョウバエ PARP cDNA は他の種と異なり 2 種類の cDNA が存在し、そのうちの 1 つは PARP の自己修飾領域 (AM domain) に対応する遺伝子が欠損したものであった。ショウジョウバエ PARP のこの領域にはロイシンジッパーモチーフがあり、他のタンパク質と相互作用している可能性が指摘された。そこで我々はこの自己修復領域と相互作用する因子を探索し、PARP の機能を解明しようと試みた。

### (対照と方法)

ショウジョウバエ PARP の AM domain を glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として大腸菌内で発現し精製した。また AM domain のロイシンジッパーモチーフの 2, 3 番目のロイシンをプロリンに変えた変異体も同様に精製した。これらをタンパク質プローブとしてショウジョウバエ  $\lambda$ gt11 cDNA ライブラリーより、Far-Western screening 法を用いて、結合するタンパク質をコードする cDNA を単離した。単離された遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST 及び FASTA プログラムを用いてホモロジーとモチーフの検索を行った。

### (結果)

#### 1) 遺伝子の単離

60万個のショウジョウバエ  $\lambda$ gt11 cDNA ライブラリーより19個のクローンを単離した。これらのクローンは GST-AM (AM domain と GST との融合タンパク質) に結合性を示すが、GST には結合性を示さない。単離した cDNA クローンは PARP-binding protein (PBP) と名付けた。cross-hybridization によって、19個のクローンは 6 種類の独立の cDNA クローンからなることがわかった。今回の研究の対象とした PBP-3 と PBP-12 は 19 個のクローンの中でそれぞれ 4 個と 2 個の割合で得られた。

## 2) 遺伝子配列

PBP-3, PBP-12cDNA の遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列のコンピュータ解析の結果, PBP-3とPBP-12の carboxyl 末端は真核生物のリボソームタンパク質 L23a, L22とそれぞれ60%以上のホモロジーを持つことがわかった。また PBP-3は各種の真核生物のリボソームタンパク質 L23に共通してみられる rRNA 結合共通配列を carboxyl 末端にコードしていた。PBP-3, PBP-12は共に, ショウジョウバエ以外のリボソームタンパク質 L23a や L22の cDNA よりも約 2 倍長く, amino 末端に histone H1に類似したアラニン, リシン, プロリンの豊富な配列を余分に持つ新規なリボソームタンパク質であることがわかった。

## 3) ノーザンブロット解析

PBP-3, PBP-12の mRNA はショウジョウバエの胚および培養細胞株の S2細胞の両方において, 1.1kb と1.2kb の単一なバンドとして確認された。

## 4) ロイシンジッパーモチーフ変異体タンパク質の結合実験

PBP-3, PBP-12のアミノ酸配列にはロイシンジッパーモチーフは見られなかった。PARP のロイシンジッパーモチーフ変異体 GST-AM タンパク質を用いて Far-western blotting を行った結果, 結合能は GST-AM タンパク質と変わらなかった。

### (考察と結語)

ホモロジーおよびモチーフ検索の結果, PBP-3, PBP-12はショウジョウバエリボソームタンパク質 L23a と L22 であることが強く示唆された。また BDGP/HHMI ショウジョウバエ EST プロジェクトにより登録されている遺伝子の20クローン以上が, PBP-3, PBP-12 cDNA の配列と一致することから, この cDNA はクローニングの際に生じたアーチファクトでは無いことが証明された。

最近, 電子顕微鏡により PARP は HeLa 細胞内では核小体に濃縮され, RNA 合成阻害剤を加えると核質内に拡散していくとの報告がある。核小体はリボソーム合成の場であり, リボソームタンパク質が豊富に存在する。今回の実験で, 単離された L22および L23a が PARP と相互作用するという結果はこの報告に矛盾しない。

今回ショウジョウバエ PARP に存在するロイシンジッパーモチーフは, L22および L23a の PARP との相互作用には機能していないことが分かった。最近, 塩基除去修復タンパク質である XRCC1が PARP の AM domain とそれぞれ BRCT (BRCA1 C terminus) モチーフを介して結合することが報告された。このモチーフはタンパク質間相互作用を示唆するもので, DNA 修復や DNA 損傷応答性細胞周期チェックポイントに関連するタンパク質に広くみられる。よって L22および L23a の PARP との相互作用は AM domain の BRCT モチーフを介して結合している可能性がある。

ショウジョウバエのリボソームタンパク質 L22と L23sa は, 他の生物種で対応する L22と L23a に比べてリシンが豊富にあるヒストン様配列を amino 末端に持っているが, この意義については不明である。ヒストン H4はヌクレオソームを構成する際にリシン残基にアセチル化を受けることが分かっている。またヒストン H1, H2B, H4はポリ ADP-リボシル化を受けることも報告されている。このことから, ショウジョウバエ L23a と L22は amino 末端のヒストン様配列を介して DNA と結合し, ポリ ADP-リボシル化やアセチル化を受けることにより核小体の機能調節を行っているかもしれない。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, ショウジョウバエ・ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) の自己修飾領域と相互作用する因子を同定したものである。今回解析した PBP-3と PBP-12は, そのカルボキシル末端で真核生物のリボソーム蛋白質 L23a, L22とそれぞれ60%以上の相同性を持ち, アミノ末端にはヒストン H1に類似したアラニン, リシン, プロリンの豊富な配列を持つ新規なリボソーム蛋白質であった。この結合は PARP に存在するロイシンジッパー

モチーフではなく、BRCT (BRCA1 C terminus) モチーフを介している可能性が示唆された。

本研究は PARP の機能解析を進める為の指針を与えたものと評価される。今後は PARP と PBP-3 と PBP-12 の結合の意義を解明、PARP の機能的な解析が待たれる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。